

THESIS

BONN

1969

ORIENTIERTE PRÄZIPITATION VON KRISTALLINEN CALCIUM-
PHOSPHATEN AUF PRÄPARIERTEN RATTENSCHWANZSEHNEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Heinz-Jürgen Klippe
aus Danzig in Westpreußen

Bonn 1969

ORIENTIERTE PRÄZIPITATION VON KRISTALLINEN CALCIUM-
PHOSPHATEN AUF PRÄPARIERTEN RATTENSCHWANZSEHNEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Heinz-Jürgen Klippe
aus Danzig in Westpreußen

Bonn 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

1. Referent: Priv. Doz. Dr. med. K. J. Münzenberg
2. Referent: Prof. Dr. med. H. Rössler

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 1969

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. H. Rössler

Druck: Richard Schwarzbild, Witterschlick bei Bonn

Meinen Eltern und meiner Frau
in Dankbarkeit
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

G l i e d e r u n g

- 1) Einleitung (Knochenbildungstheorie)
- 2) Methode
- 3) Ergebnisse
Orientierte Präzipitation von kristallinen Calcium-
phosphaten auf präparierten Rattenschwanzsehnen
- 4) Besprechung der Ergebnisse
- 5) Zusammenfassung
- 6) Literaturverzeichnis

1) E i n l e i t u n g (Knochenbildungstheorie)

Das Organ Knochen setzt sich aus drei Hauptbestandteilen zusammen:

1. den Zellen (Osteoblasten bzw. Osteocyten)
2. der Grundsubstanz (organische Matrix) und
3. dem Knochenmineral (den Knochenmineralien)

Das organische Stroma besteht aus dem Faseranteil Kollagen und der Grundsubstanz.

Die Fasern, die wir im Lichtmikroskop sehen, sind bis zu einigen cm^{-3} dick. Im Elektronenmikroskop kann man eine noch feinere Aufgliederung wahrnehmen; man erkennt, daß diese Fasern sich aus Fibrillen von mehreren Hundert Å Breite zusammensetzen ($1 \text{ Å} = 10^{-8} \text{ cm}$), die durch eine periodisch wiederkehrende Querstreifung in 600 - 700 Å Abstand gekennzeichnet sind.

Kollagen, welches den Hauptanteil der Fasergewebe des Körpers ausmacht, ist ein hochmolekulares Protein, und seiner Struktur- aufklärung wurden in den vergangenen Jahren eine Anzahl wichtiger Arbeiten gewidmet.

Kollagen besteht aus Aminosäuren, vor allem aus Glyzin, Prolin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin. Diese Aminosäuren bilden, zu je 1000 Einheiten zusammengelegt, eine spiralförmige Peptidkette. Drei solcher Ketten werden miteinander zu einer größeren Spirale ("coiled-coil", "super-helix") verschlungen und ergeben ein Kollagenmolekül, Tropokollagen, mit den folgenden Abmessungen: ca. 2800 Å Länge, ca. 14 Å Breite, Molekulargewicht ca. 300000 - 360000. Diese Tropokollagenmoleküle verbinden sich dann zu den elektronenoptisch sichtbaren Fibrillen durch seitliches Aneinanderlegen, wobei sich je ein Molekül um ungefähr 1/4 der Länge verschoben an das andere legt, so daß die periodische Querstreifung in 600 - 700 Å Abstand zustande kommt. (KÜHN 1961, 1962, 1967)

Es ist die Aufgabe der Osteoblasten im Knochengewebe, diese Tropokollagenmoleküle intrazellulär zu bilden. Dann erfolgt extrazellulär die Polymerisation der einzelnen Tropokollagenmoleküle zu den Fibrillen unter Einwirkung verschiedener Faktoren (pH,

Ionenstärke, Ionenkonzentration, Anwesenheit von Mucopolysacchariden).

Das Kollagen, welches rund 95 % der organischen Matrix des Knochens ausmacht (DALLEMAGNE und RICHELLE 1965), dient zur orientierten Abscheidung des Knochenminerals, wodurch der Knochen seine kombinierten Eigenschaften von Elastizität und Starre erhält.

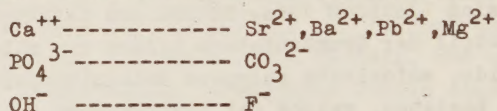
Mit dem Namen Grundsubstanz wird der zwischen den Zellen und den Fibrillen gelegene Anteil des organischen Stromas bezeichnet. Man nahm früher an, daß diese Grundsubstanz der Bindegebe homogen und amorph sei, denn diesen Eindruck bietet sie im Lichtmikroskop; auf Grund neuerer Untersuchungen weiß man aber, daß diese Grundsubstanz hochstrukturiert und reich an sauren Mucopolysacchariden ist, die mit nicht-kollagenartigen Proteinen verbunden sind (JACKSON 1964, BENEKE und SANDRITTER 1968). Den Hauptbestandteil der Grundsubstanz bilden vor allem die Mucopolysaccharide, anionische polymere Molekülkomplexe, die aus Hexosaminen bestehen, welche mit Hexuronsäure oder einer Hexose wechseln. Sie sind an ein nicht-kollagenartiges Protein gebunden und diese Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe können infolge ihrer mehrfachen anionischen Ladung als Ionenaustauscher wirken. Man nimmt heute an, daß die Funktion der Grundsubstanz im Knochen darin besteht, als Mittler beim Transport von H_2O , Ionen und Stoffwechselprodukten zwischen Gefäßen und Zellen zu wirken. (FITTON JACKSON 1964)

Daß eine enge Beziehung zwischen dem Vorhandensein der Mucopolysaccharide und der Mineralablagerung im Knochengewebe besteht, wird von fast allen Autoren angenommen; jedoch herrschen verschiedene Auffassungen über die Art dieses Zusammenhanges: Einige Autoren glauben, daß Mucopolysaccharid-Proteine die Abscheidung der Kristalle fördern (SOBEL, BURGER und NOBEL 1962), während sie für andere die Bildung der Kalkkristalle hemmen und somit zum Beispiel die Verkalkung in den sog. "weichen" Bindegeweben (Sehnen, Bänder usw.) verhindern. (HASS 1943, GLIMCHER 1959, FITTON JACKSON 1964)

Die Bildung der organischen Matrix, also der kollagenen Fasern sowie der Grundsubstanz, steht unter hormonellem Einfluß. Die Einwirkung der verschiedenen Hormone ist noch nicht völlig geklärt. (NORDIN 1965, DALLEMAGNE 1964)

Der dritte Anteil des Knochengewebes besteht aus anorganischen Calciumphosphat-Mineralen.

Man weiß heute, daß dieses Knochenmineral zu seinem größten Teil kristallographisch die Eigenschaften von Hydroxylapatit besitzt (CARLSTRÖM 1955, POSNER 1960, NEUMAN und NEUMAN 1958), aber chemisch ist der Aufbau dieser anorganischen Kristalle nicht immer identisch mit dem des Hydroxylapatits ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Das kommt zustande durch den heteroionischen Austausch. Ca^{++} , PO_4^{3-} und OH^- können durch andere Ionen ersetzt werden, die normalerweise nicht zu den Gitteratomen des Hydroxylapatits zählen:



Hinzu kommt noch, daß auch im Laufe ihrer Alterung die Kristalle eine Änderung ihrer chemischen Bestandteile erfahren können, wobei jedoch der kristallographische Strukturtypus des Hydroxylapatits erhalten bleibt.

Die Form der Apatit-Kristalle kann man sich als hexagonale, längliche Plättchen einer ungefähren Größe von 400/200/50 Å denken, wobei diese Werte jedoch in ziemlich weiten Grenzen schwanken können. Was neben dem Hydroxylapatit das Vorkommen weiterer Mineralien im Knochen betrifft - vor allem von Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und von Octocalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) - so wird hierauf in einem späteren Kapitel näher eingegangen. Für das Verständnis der Bildung dieser Kristalle ist folgendes wichtig:

Fällt man Calciumphosphat in kristalliner Form in vitro aus, so benötigt man dazu Konzentrationen von $\text{Ca} \cdot \text{P} = \text{ca. } 35 - 50 \text{ mg\%}$, also viel höhere Konzentrationen an Ca^{++} und PO_4^{3-} , als sie in

der extrazellulären Flüssigkeit vorkommen (hier herrschen Werte von Ca·P von ca. 16 - 18 mg%, FLEISCH 1961).

Lange Zeit diente eine Hypothese zur Erklärung dieser scheinbaren Unvereinbarkeit: ROBISON stellte 1932 die Theorie auf, daß in den verkalkenden Geweben eine lokale Erhöhung der Ca·P-Konzentration bis zur Höhe der in vitro-Werte zu finden sei. Dieser für die Kristall-Präzipitation nötige Wert werde bewirkt durch einen - jedoch nur hypothetischen - Phosphorsäureester, der dann durch die alkalische Phosphatase zerstört werde, was die lokale Erhöhung der Ca·P-Konzentration zur Folge habe. Heute wird diese Theorie allgemein verlassen, da sie bei weitem nicht ausreicht, um die bei der Verkalkung auftretenden Phänomene befriedigend zu erklären (MC LEAN und URIST 1955, 1961; NEUMAN und NEUMAN 1958). Es konnte im Blutserum nie eine genügend große Konzentration an Phosphateestern gefunden werden, die eine so ablaufende Mineralisation ermöglichen würden. (FLEISCH 1961)

Jüngste Forschungen haben ergeben, daß Calciumphosphat durchaus in mineralischer Form ausfallen kann, auch bei den genannten physiologischen Konzentrationen von ca. 16 - 18 mg%, vorausgesetzt, es sind bestimmte lokale Bedingungen gegeben.

Durch zahlreiche Untersuchungen ist belegt, daß sich bei allen Lebewesen die Phosphatkristalle (ebenso die Carbonatkristalle) jeweils auf einer organischen Matrix ablagern. Beim Säuger kommt dem Kollagen hierbei die entscheidende Rolle zu (ROBINSON und WATSON 1955, GLIMCHER 1959, 1960, FITTON JACKSON 1957, 1960, 1964). Die von einigen Autoren geäußerte Ansicht, daß Mucopolysaccharide dafür in Frage kommen (BANGA, BALO und SCARO 1961, SOBEL, BURGER und NOBEL 1962) muß als unrichtig angesehen werden. Es ist im Gegenteil so, daß Mucopolysaccharide eine Verkalkung verhindern. Schon früher (BUCHER und STRAUMANN 1937) wurde dem Kollagen die Eigenschaft zugeschrieben, die Ablagerung des Knochenminerals im Sinne einer Nukleation einzuleiten. Nachdem diese Vorstellung zunächst wenig Beachtung fand, nahmen NEUMAN und NEUMAN (1958) diese These wieder auf, und nun ergaben

sich in vielen Experimenten Hinweise darauf, daß in Anwesenheit von Kollagen in vitro Calciumphosphat-Kristalle bei relativ niedrigen Ca-P-Konzentrationen ausfallen, in Höhe der physiologisch vorkommenden, extrazellulären Werte. Auch morphologisch wurde diese Annahme durch elektronenoptische Befunde bestätigt: Viele Autoren berichten, daß die ersten sichtbaren Kristalle in ganz enger Beziehung zu den Kollagenfibrillen stehen. (ROBINSON und WATSON 1955, GLIMCHER 1959, 1960, FITTON JACKSON 1957, 1960, 1964, HÖHLING 1966)

Schon von EBNER beschrieb 1887, daß die anorganischen Anteile des Knochens negativ, einachsrig und doppelbrechend seien und mit ihrer optischen Achse in Längsrichtung der Kollagenfasern liegen, was durch W.J.SCHMIDT (1933, 1947) bestätigt wurde.

Auf die Annahme von SCHMIDT (1947), die anorganische Substanz umhülle die Kollagenfasern wie einen Mantel, ergaben sich von einigen Autoren unterschiedliche Erklärungen: WOLPERS (1949) nahm einen schuppenartigen Panzer aus nadelförmigen Kristallen von 40-1000 Å Länge und 30-60 Å Breite an, mit bevorzugter Absorption an die D- bzw. A- Streifen der Kollagenfasern. Einige Autoren bestätigten dies (ROBINSON und WATSON 1952, 1953). Andere (BECHER, HOEGEN und PFEFFERKORN 1954) nahmen ein Gitterwerk anorganischer Substanz an, in welches die kollagenen Fasern eingelagert sind. Weitere Untersucher (ASCENZI 1955, ASCENZI und BONUCCI 1965) meinen jedoch, der anorganische Mantel sei aus Körnchen aufgebaut, die in Ketten liegen- oder ein dreidimensionales Gitter bilden, dessen Maschen 200 - 250 Å messen, dabei bilde die anorganische Substanz Röhrchen, in denen sich die Kollagenfibrillen befinden.

Auch röntgenographische Studien bestätigen den Befund der engen, geordneten Verbindung zwischen kollagenen Fibrillen und anorganischen Kristallen. (RAMACHANDRAN und KARTHA 1954, 1955, RAMACHANDRAN 1955, 1956, 1963, SANTHANAM 1959, AMBADI 1959)

Kollagenfibrillen begünstigen also offensichtlich die Präzipitation von Knochenmineral; zur Erklärung dieser Tatsache wurden verschiedene Ansichten geäußert. So sollen - auf der chemischen

Struktur des Kollagens aufbauend -~~6~~-Aminogruppen (SOLOMONS und NEUMAN 1960), Phosphoseriengruppen (GLIMCHER und KRANE 1964) oder ein bestimmter phosphorylierter Zucker des Kollagenmoleküls (KRANE und GLIMCHER 1965) als Kontaktstellen in Frage kommen, und auf der Seite der anorganischen Kristalle die Ca^{2+} -Valenzen, bzw. die PO_4^{3-} -Gruppen (HÖHLING 1966). Diese Ansichten vernachlässigen jedoch die röntgenographische Kristallstruktur des Kollagens und der Minerale, denn hier erhalten wir entscheidende Hinweise auf bestehende Zusammenhänge zwischen den Kollagenmolekülen und den auf ihnen sich abscheidenden Kalkkristallen. Das haben die Ergebnisse solcher mit Klein- und Weitwinkelbeugungen vorgenommenen Röntgenuntersuchungen gezeigt. Die entsprechenden Einzelheiten werden später besprochen.

Bisher wird durch diese Tatsachen aber nicht erklärt, wieso das Kollagen des Knochengewebes diese fördernden (Nukleations-) Eigenschaften besitzt (BASSETT 1962, 1965) und das ihm strukturell völlig gleiche Kollagen der Bindegewebe (KNESE 1959), Knorpel, Sehnen, Bänder usw., normalerweise nicht verkalkt.

Knorpel ist zwar ein sehr calciumreiches Gewebe (1 g Ca/pro kg Substanzgewicht), in gleichem Maße aber ist sein Gehalt an Mucopolysacchariden sehr hoch, bei weitem höher als der des Knochens. Diese Mucopolysaccharide sind es, die die nukleationsfördernde Eigenschaft der kollagenen Fibrillen hemmen. Aus diesem Grunde verkalken normalerweise auch Sehnen nicht.

Man muß zusätzlich aber noch weitere Befunde berücksichtigen. (HASS 1943, GLIMCHER 1959, FLEISCH und NEUMAN 1961, FLEISCH und BISAZ 1962, FLEISCH 1966). FLEISCH fand, daß in allen Geweben zumindest ein Inhibitor der Verkalkung existiert, den er als anorganisches Pyrophosphat identifiziert hat. Auf Grund seiner Untersuchungen folgert er, das anorganische Pyrophosphat sei in der Lage, durch seine "Vergiftung" der nukleierenden Zentren auf den Kollagenfibrillen in vitro wie in vivo eine Mineralablagerung wirkungsvoll zu hemmen. (FLEISCH 1961, 1964) Da nun alle Gewebe, welche normalerweise verkalken, also der Knochen in erster Linie, in hohem Maße das Ferment Pyrophosphatase enthalten, was durch viele Experimente bestätigt wird, nimmt FLEISCH an, daß im

Knochen die Pyrophosphatase den Inhibitor (= anorganisches Pyrophosphat) durch Spaltung unwirksam macht. Nun erst kann der Vorgang der Mineralablagerung durch die Nukleationszentren (= Keimbildungszentren) der Kollagenmoleküle eingeleitet werden und ablaufen.

Nahezu zwanglos aber werden die Beziehungen zwischen Kollagen und Mineral - einschließlich der Präzipitationsvorgänge - erklärt durch epitaktische Vorstellungen.

Nach NEUHAUS (1950/51) ist Epitaxie "eine jede gesetzmäßige, strukturabhängige Verwachsung zwischen kristallinen und subkristallinen, geordneten Phasen, insbesondere zwischen Kristallindividuen."

Kennzeichnend für Epitaxie ist die gesetzmäßige Orientierung von zwei miteinander verwachsenen Kristallen, wobei beide mindestens eine Kristallfläche und eine Zonenrichtung miteinander gemeinsam haben.

Diese Definition der Epitaxie erstreckt sich auch auf die in der Osteologie auftretenden orientierten Verwachsungen, die uns im Speziellen beschäftigen; denn hierbei handelt es sich um die epitaktische Verwachsung "zweier verschiedener, weder isomorpher, noch isotypen, noch bindungsverwandter Kristallarten." Kollagen und Apatit sind weder isotyp noch isomorph. Isotypie bedeutet bei Kristallen, daß sie den gleichen Bautypus aufweisen, daß ihre Bestandteile in gleichem Mengenverhältnis zueinander stehen (z.B. NaCl, PbS und MgO). Isomorphie liegt dann vor, wenn solche isotypen Kristalle Mischkristalle bilden (z.B. NaCl und PbS sind zwar isotyp, aber nicht isomorph, denn sie bilden keine Mischkristalle; aber NaCl und KJ sind mischbar, also isomorph).

Wir wissen heute, daß orientierte Verwachsungen zwischen solchen Kristallindividuen bewirkt werden durch bereits eindimensionale Analogien im Gitterbau zweier Kristalle (früher nahm man an, daß zumindest eine zweidimensionale Analogie im Gitterbau dazu nötig sei - persönl. Mitteilung Prof. NEUHAUS). Diese Analogie muß vorliegen bei den miteinander verwachsenden Ebenen der Kristalle, denn diese Ebenen müssen affin sein, d.h. die Maschenweite und die Form des Gitterbaues müssen einander nahe

verwandt sein. Als Richtwert dafür gilt, daß die jeweiligen Dimensionen der Gitterebenen nicht mehr als ca. 15 % sich voneinander unterscheiden dürfen, damit noch Epitaxie stattfindet.

Man nennt bei diesem Vorgang den vorgegebenen Kristall Träger oder Unterlage, den zweiten, sich orientiert darauf abscheidenden Anteil Gast oder Adsorbat.

Für solche epitaktische, d.h. orientierte Substanzabscheidung gibt es in der Kristallographie unzählige Beispiele, auch zwischen einem anorganischen und organischen Partner. So lassen sich die organischen Substanzen Urotropin, p-aminobenzoesäure und Hydrochinon auf Gips orientiert abscheiden (NEUHAUS 1950/51), K.H. SEIFERT (1957) sowie H. SEIFERT (1961) weisen in ihren Arbeiten epitaktische Beziehungen zwischen Quarz (anorganisch) und Peptiden (einfache Eiweißkörper aus wenigen Aminosäuren) nach.

Solche epitaktischen Vorgänge sind bei dem Ablauf der Knochenbildung und zur Klärung der Knochenstruktur zweifach von Wichtigkeit:

1. Man kann damit die bestehende und von vielen Autoren sowohl elektronenmikroskopisch wie auch röntgenographisch bestätigte orientierte Beziehung zwischen der Richtung der kollagenen Fibrillen und der kristallographischen c-Achse der Hydroxylapatitkristalle erklären.
2. Durch epitaktische Vorgänge kann man die verwickelten physikochemischen Vorgänge bei der anorganischen Knochensubstanzbildung näher deuten.

Daß enge strukturelle Zusammenhänge zwischen den kollagenen Fibrillen und den anorganischen Kristallen bestehen, ist vielfach nachgewiesen. Jedoch über die genaue Art dieser gegenseitigen Beziehung herrschen bei den einzelnen Autoren zum Teil abweichende Meinungen. Man hat unterschiedliche Baugruppen des Kollagens als wichtig angesehen. Näheres wurde bereits oben berichtet.

Der charakteristische chemische Bau eines Tropokollagen-Moleküles ist bekannt. Die Bildung größerer Einheiten, Subfibrillen und Fibrillen, kommt durch seitliche Anlagerung solcher Dreierhelices

zu einem sog. "cylindrical lattice", bzw. "spiral lattice" zustande (HÖHLING 1966).

Röntgenographische Strukturuntersuchungen des Kollagens (HARTMANN, GATTOW und FRICKE 1957, HARTMANN 1960, MÜNZENBERG und GATTOW 1963, RAMACHANDRAN 1963) haben ergeben, daß das Kollagen ein ganz eigenes, strukturspezifisches Röntgenmuster ergibt, welches auf seiner kristallähnlichen geordneten Struktur beruht.

Nach DAHMEN und HÖHLING (1962) ist es beim Kollagenmolekül eine im Abstand von $28 \text{ \AA}$ bzw. $33 \text{ \AA}$ wiederkehrende Periode, sowie eine Periode von $100 \text{ \AA}$ (= das Dreifache der $33 \text{ \AA}$ -Periode, RAMACHANDRAN 1961, 1963), die neben anderen d-Werten des Kollagens von Bedeutung ist. Später wird gezeigt, daß diese röntgenographisch ermittelten, strukturspezifischen Abstände auf dem Kollagen eine entscheidende Rolle als Nukleationspunkte bei der epitaktischen Kristallabscheidung spielen.

Auf Grund dieser geordneten, kristallinen Struktur des Kollagens, wird bei dem epitaktischen Wachstum in der Osteologie das Kollagenmolekül zum Träger, auf dem sich das Hydroxylapatit - oder ihm verwandte Minerale - infolge seines analogen Gitterbaues als Gast ablagert.

STRANSKI (1928) stellte fest, daß der Vorgang der Keimbildung einer Gastsubstanz auf der Kristallebene der entsprechenden Unterlage um so leichter vor sich geht, je affiner die Netzebenen der beiden Kristalle sind. Ist die Gitteranalogie dieser beiden Kristalle genügend groß, so kann durch die lokale, zeitweilige Übersättigung der Lösung schon eine Abscheidung des zweiten Mineralen (= des Gastes) auf dem Trägerkristall ausgelöst werden, also beim Knochen auf dem Kollagen.

1958 wurden vom STRATES und NEUMAN Ausfällungsversuche mit verschiedenen Kollagenen gemacht. In ähnlicher Weise, wenn auch mit einer anderen Zielsetzung, machten FLEISCH (1961) sowie FLEISCH und NEUMAN (1960, 1961) solche Ausfällungsversuche.

Diese Versuche zeigen deutlich, daß Kollagen die Fähigkeit besitzt, das zu erwartende $\text{Ca} \cdot \text{P}$ -Produkt signifikant zu erniedrigen und damit die Präzipitation einer festen Calciumphosphat-Substanz aus einer entsprechenden Lösung von $\text{Ca} \cdot \text{P}$ -Ionen zu

beschleunigen, oder anders ausgedrückt, daß in vitro bei Anwesenheit von Kollagen eine Kalkpräzipitation auch bei einem Ionenprodukt, wie es in der extrazellulären Flüssigkeit in vivo herrscht, stattfindet. Das zeigt erneut, daß die alte These von ROBISON (1932), ein hypothetischer Phosphatester sei für die Erreichung eines notwendigen $\text{Ca} \cdot \text{P}$ -Produktes erforderlich, überholt ist.

STRATES und NEUMAN (1958) zeigten aber auch, daß - im Gegensatz zu Kollagen - Fibrin und Gelatine keine präzipitationsfördernden Effekte haben. Gerade das weist deutlich darauf hin, daß bei der Präzipitation die Strukturzusammenhänge eine wichtige Rolle spielen, denn bekanntlich ist Gelatine die amorphe Form des Kollagens. Wenn also kristallines Kollagen als Kern bei der Keimbildung von Apatitkristallen dienen kann, aber die amorphe (nichtkristallin strukturierte) Gelatine das nicht kann, so muß die Fähigkeit des Kollagens, als Träger die Nukleation von anorganischen Knochenkristallen zu ermöglichen, in seiner Gitterstruktur liegen.

Das wird durch die Werte der strukturanalogen Gitterabstände zwischen Hydroxylapatit und Kollagen bestätigt, und es ist wahrscheinlich so, daß die (100)-Fläche des Hydroxylapatites mit der kollagenen Fibrille verwächst, wobei die c-Achse der Fibrille und die Längsachse des Apatitkristalles parallel zueinander liegen.

Eine Kristallfläche in einem dreidimensionalen Koordinatennetz wird wie folgt definiert:

- " An einem Kristall liegen die Flächen so, daß sie entweder:
1. alle 3 Achsen schneiden oder - genügend verlängert - schneiden können,
 2. nur 2 Achsen schneiden und der dritten parallel gehen,
 3. nur 1 Achse schneiden und den beiden anderen parallel gehen."
- BRAUNS und CHUDOBÄ (1968)

Hieraus ergeben sich dann die sieben einfachen Flächentypen, die die Mineralogie unterscheidet.

"Das Verhältnis der Achsenabschnitte einer Kristallfläche - der Parameter - nennt man ihr Parameterverhältnis. Es wird ausgedrückt in der Formel $a:b:c$. Geht eine Fläche einer Achse parallel, so schneiden sich beide im Unendlichen, ausgedrückt in dem Zeichen ∞ (Beispiel: $a:a:\infty a$ = eine Fläche schneidet von 3 gleichen Achsen 2 im gleichen Verhältnis und geht der dritten parallel). Für die eben genannte (100)-Fläche des Hydroxylapatits - die Fläche wird als Formsymbol in ()-Klammern gesetzt - gilt das Parameterverhältnis: $a:\infty b:\infty c$. Damit wird also ausgedrückt, daß die (100)-Fläche 2 Achsen parallel geht (nämlich den Achsen b und c), während eine Achse (die Achse a) geschnitten wird." (BRAUNS und CHUDоба 1968)

Tabelle über strukturanaloge Gitterabstände zwischen Kollagen und Apatit

Apatit	Kollagen	Richtung	-Differenz
4.6,68 = 27,52	28,6	c	- 3,8 %
3.9,42 = 28,26	2.14 = 28	a	+ 0,9 %

(die Werte sind in Å-Einheiten angegeben)

Die Werte der Tabelle zeigen, daß die Differenz im Gitterbau von höchstens 15 %, die noch zum epitaktischen Wachstum benötigt wird, bei Hydroxylapatit und Kollagen noch bei weitem unterschritten wird. Bei beiden liegt also eine sehr weitgehende Strukturanalogie im Gitterbau vor, die einem epitaktischen Wachstum natürlich zugute kommt.

Zu ganz ähnlichen Ergebnissen kommt auch PERDOK (1963) bei seiner Betrachtung über das epitaktische Aufwachsen von Hydroxyl-Fluor-Apatitkristallen des Zahnschmelzes auf die Polypeptidketten des Kollagens.

Auf diesen Tatsachen aufbauend, kommen einige Autoren (STRATES und NEUMAN 1958, NEUMAN und NEUMAN 1958, FLEISCH 1966) zu der Frage, die bereits kurz erwähnt wurde:

Warum verkalkt dann nicht jedes Kollagen, sondern normalerweise nur das in dem organischen Stroma des Knochengewebes befindliche

kollagene Fasergewebe, während das Kollagen in den übrigen Bindegeweben des Körpers unter physiologischen Verhältnissen unverkalkt bleibt?

FLEISCH nimmt zur Klärung dieser Tatsache an, daß das von ihm als Inhibitor der Verkalkung identifizierte anorganische Pyrophosphat dafür maßgeblich sei. In Anwesenheit dieses Inhibitors wird in vitro und in vivo das Löslichkeitsprodukt $\text{Ca} \cdot \text{P}$ erheblich heraufgesetzt. In vitro von ca. 53 mg% auf 105 mg% (FLEISCH und BISAZ 1962), in vivo bei Anwesenheit von Kollagen von rd. 15 - 18 mg% auf 40 mg% und mehr (FLEISCH 1961).

Nach seiner Erklärung findet sich dieser Inhibitor in allen Bindegeweben, so daß diese normalerweise unverkalkt bleiben. Im Knochen aber wird das anorganische Pyrophosphat durch das dort vorhandene Ferment Pyrophosphatase durch Spaltung unwirksam gemacht; nun entfaltet das vorhandene Kollagen ungehindert seine aktivierenden Eigenschaften, indem es als Träger die Nukleation von Calciumphosphat-Kristallen bewirkt.

Diese Ansicht ist auch grundsätzlich richtig, denn anhand vieler Beispiele in der physikalischen Chemie findet man die Erscheinung bestätigt, daß durch bestimmte Stoffe ein epitaktisches Aufwachsen von Kristallen schlagartig verhindert werden kann. Ein einfaches Mittel hierzu ist das Aufbringen von Öl auf eine Trägersubstanz. Die Erklärung dafür ist: Das mehr- oder minder visköse Öl verdeckt die entsprechenden Nukleationsstellen der Trägersubstanz, so daß jetzt eine Epitaxie nicht mehr stattfinden kann.

Bei der Hemmung einer Verkalkung in vivo muß nach unserer Ansicht auch bedacht werden, daß in dem interfibrillären Bereich des jeweiligen Gewebes Mucopolysaccharide vorhanden sind und die Annahme besteht zu Recht, daß im normalen, unverkalkt bleibenden Gewebe diese Mucopolysaccharide als Inhibitor einer Verkalkung entgegenwirken. (HASS 1943, GLIMCHER 1959, HAMERMAN und SCHUBERT 1962, KRANE und GLIMCHER 1965, GLIMCHER und KRANE 1964, FITTON JACKSON 1964) Denn z.B. in einer Sehne werden die einzelnen kollagenen Fibrillen von einer mucopolysaccharidhaltigen Hülle umgeben (KUHNKE 1961) und so quasi die Nukleationspunkte des

Kollagens verdeckt. Daher kann dann keine Epitaxie eintreten und eine Sehne bleibt normalerweise unverkalkt.

Im Knochen jedoch und überall dort, wo Knochen neu gebildet wird - auch ektopischer oder pathologischer Knochen, z.B. bei einer myositis ossificans -, werden die Mucopolysaccharide abgebaut, was mit histochemischen Methoden nachzuweisen ist. Mit dem Ablauf der Knochenverkalkung geht eine sichtbare Veränderung der Grundsubstanz einher, die sich histologisch in einer Änderung ihres färberischen Verhaltens (Abnahme der Basophilie) zeigt. Der Knorpel mit einem recht hohen Calciumgehalt bleibt unverkalkt wegen seines großen Anteils an Mucopolysacchariden, die die kollagenen Fibrillen des Knorpelgewebes umhüllen. Die Nukleationspunkte des Kollagens werden völlig bedeckt, und damit ist eine epitaktische Anlagerung von Gastsubstanzen nicht mehr möglich.

Eine gleiche Einwirkung muß man auch für den Inhibitor der Verkalkung, Pyrophosphat, sowie für ein anderes Polyphosphat, Metaphosphat, annehmen. Daß Pyrophosphat bzw. Metaphosphat die Kristallisation von Calciumsalzen verhindert (vor allem von Calciumcarbonat), ist schon lange bekannt. (REITEMEYER und BÜHRER 1940, BÜHRER und REITEMEYER 1940).

Natrium-Metaphosphat verhindert beispielsweise auch die Bildung von Kesselstein, indem es mit Erdalkali-Ionen wasserlösliche Komplexe bildet. In der Industrie wird dieser Stoff genutzt als "Wasserweichmacher" zur Verhütung der Verkalkung von Rohren, Wasserbehältern usw. (RUDY 1960)

Die Hemmung der Nukleation durch Bildung von Polyphosphat-Calcium-Komplexen wird nicht von allen Autoren als richtig angesehen (FLEISCH und NEUMAN 1961, FLEISCH 1964, FLEISCH und BISAZ 1966). Uns erscheint jedoch in den Ansichten von BUCKLEY (1961) eine unserer Vorstellung nahekommende Erklärung vorzuliegen. Nach ihm blockieren die Polyphosphate das Kristallwachstum, indem sie sich an die Kristalloberfläche adsorbieren. Das Pyrophosphat bzw. Metaphosphat verdeckt demnach gewissermaßen die strukturspezifischen Abstände des Kollagens (= seine Nukleationspunkte) und damit kann ein epitaktisches Aufwachsen von

Hydroxylapatit oder anderen Knochenmineralien nicht mehr stattfinden. Diese Vorstellung wird auch durch experimentelle Arbeiten einiger Autoren gestützt. (FITTON JACKSON 1964, GLIMCHER 1959, GLIMCHER und KRANE 1964, KRANE und GLIMCHER 1965).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, anhand der Inkubation von organischem, kollagenem Faser-material in einer Lösung von Calcium-phosphat zu prüfen, ob und in welcher Form eine geordnete, gesetzmäßige, also eine epitaktische Beziehung zwischen kollagenen Fibrillen und anorganischem, kristallinem Calcium-phosphat festzustellen ist.

Unsere Untersuchungen sollten auch der Frage nachgehen, welche einzelnen Minerale bei der durch Kollagen induzierten Mineralabscheidung präzipitiert wurden, wenn ein physiologischer pH-Wert vorliegt. Nach NEUMAN und NEUMAN ist BRUSHIT ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) bei einem alkalischeren pH-Wert als 6,2-6,9 nicht mehr existenzfähig. Im Knochen aber konnte BRUSHIT eindeutig nachgewiesen werden (MÜNZENBERG, 1968).

In weiteren Versuchen wurde ermittelt, ob sich durch Zusatz von Natrium-Metaphosphat zu einer solchen Inkubationslösung ein verändertes Verhalten der organischen (Kollagenfibrillen) und anorganischen (kristallines Calciumphosphat) Partner zueinander feststellen läßt.

2) M e t h o d e

Die für die Versuche verwendeten Ratten waren weiße Wistar-Ratten, im Alter zwischen 6 - 12 Monaten und einem Gewicht von durchschnittlich 150 - 180 gr; die Schwanzstärke der Tiere betrug - an der Wurzel gemessen - rd. 6 - 8 mm und die Länge der Schwänze von Wurzel bis Spitze rd. 13 - 14 cm. Nach der Tötung wurde den Tieren sofort der Schwanz an der Wurzel mit einem Skalpelli abgetrennt und die Schwanzsehnen daran anschließend freipräpariert.

Der anatomische Feinbau der Sehnenfaser eines Rattenschwanzes unterscheidet sich nicht vom Aufbau anderer Sehnen. Hier wie auch bei den anderen Sehnenfasern bilden die zugfesten Kollagenfasern den Hauptanteil. Sie sind parallel zu dichten Bündeln angeordnet und die relativ geringe Biegezugfestigkeit garantiert ihre nötige Biegsamkeit. Lockeres, gefäßhaltiges Bindegewebe - im wesentlichen aus mucopolysaccharidhaltiger Zwischensubstanz bestehend - umhüllt die einzelnen Faserbündel und Bündelgruppen (Peritenonium internum). Es stellt die Fortsetzung des die Sehnenoberfläche überziehenden, zarten Peritenonium externum dar.

Nach der Gewinnung des Sehnenmaterials erfolgte eine Aufspaltung der Fasern in makroskopisch möglichst dünne Faserstreifen mittels feiner Skalpelle und Präpariernadeln. Diese Sehnenfasern wurden dann für 10 Minuten in 0,1 n NaOH (Merck-Register 9141a 7406208) eingelegt.

Dieser Arbeitsgang erfolgte zur Herauslösung der mucopolysaccharidhaltigen Zwischensubstanz, die ja die einzelnen Kollagenfasern der Sehne umhüllt. Man kann Mucopolysaccharide, das geschieht in der Histologie seit langem (BARGMANN 1959, SCATCHARD, ONKLEY, WILLIAMS, BROWN 1944), entweder mittels Säuren oder Basen herauslösen.

0,1 n NaOH wurde hier angewendet, da eine Quellung der kollagenen Fasern bei Einwirkung einer solchen milden Lauge nicht erfolgt - wie sich dann auch durch das ganz typische und unveränderte Röntgenmuster der Kollagenfibrillen bei den

Aufnahmen ergab. Die Stärke der Lauge reicht jedoch aus, um die mucopolysaccharidhaltige Zwischensubstanz herauszulösen, so daß die Kollagenfibrillen mit ihren Nukleationszentren gewissermaßen "nackt" und ohne umhüllende Mucopolysaccharide vorliegen.

Nach diesem Aufenthalt von 10 Minuten in 0,1 n NaOH erfolgte eine gründliche Wässerung der Kollagenfasern durch dreimaliges Spülen in aqua destillata, so daß eine völlige Herauslösung aller etwaigen Laugenreste gewährleistet war.

Im Anschluß an diese Spülung wurden die Kollagenfasern, die im Vergleich zu ihrem unbehandelten Vorzustand bereits eine deutliche Veränderung ihres Aussehens zeigten, in die entsprechenden Lösungen eingebracht. In den Lösungen konnte man beobachten, daß die einzelnen, kleinen Kollagenfasern deutlich voneinander isoliert flottierten. In einem Brutschrank wurden die entsprechenden Präparate bei konstanter Temperatur von 37 ° C über einen Zeitraum von 16, 15, 10 oder 7 Tagen in den entsprechenden Lösungen belassen.

Die für die Aufbewahrung der präparierten kollagenen Fasern bestimmten Lösungen wurden wie folgt hergestellt (Wir danken Herrn Apotheker PRZYBYLKA an dieser Stelle sehr herzlich für die Zubereitung der Lösungen):

Verkalkungslösung (nach GOLDENBERG und SOBEL, 1952)

1. Basislösung

NaCl	700 mmol	40,92 g
KCl	50 mmol	3,73 g
NaHCO ₃	220 mmol	18,48 g
aqua dest.	ad	1000,0 ml

Diese Lösung hat einen pH-Wert von 7,9.

2. Inkubationslösung

(Ca : P = 10 : 5)

CaCl ₂ + 2 H ₂ O	2,5 mmol	0,37 g
NaH ₂ PO ₄ + 1 H ₂ O	1,6 mmol	0,22 g
Basislösung		100,0 ml
aqua dest.	ad	1000,0 ml

Diese Lösung hat einen pH-Wert von 7,5.

In einer Lösung mit dem pH = 7,5 ist das Phosphat-Ion dissoziiert in 70 % HPO_4^{--} und 30 % H_2PO_4^- (HOLLEMANN und WIBERG 1955). Das eingesetzte CaCl_2 und NaH_2PO_4 entspricht 10 mg% Calcium und 5 mg% Phosphat. (Falls erforderlich, kann ein niedrigerer pH-Wert durch Verminderung der NaHCO_3 -Konzentration erreicht werden.)

Die Inkubationslösung enthält pro Liter:

	mval Kation	mval Anion
Na^+	93,6	
K^+	5,0	
Ca^{++}	5,0	
Cl^-		80,0
HCO_3^-		22,0
H_2PO_4^-		1,6
Summe	103,6	103,6

Aus den angeführten Zahlen ergibt sich, daß das Calcium-Phosphat-Produkt bei einem Wert von 10·5 liegt, also 50 mg% beträgt, was bei in vitro-Experimenten ausreicht, um eine Bildung von Hydroxylapatit zu ermöglichen.

Diese Lösungen wurden in 50 ml-Erlenmeyer Kolben gefüllt, worin sich die kollagenen Fasern teils frei befanden, teils an einem entsprechend geformten Haken in die Lösungen hineinhingen. Die so fertiggestellten Kolben wurden mit Gummistopfen dicht verschlossen. Diese Stopfen wurden durch Heftpflaster fest in ihrer Lage fixiert und dann die Kolben in den Brutschrank eingebracht.

Nach Ablauf der verschiedenen langen Inkubationszeiten wurden die kollagenen Fasern aus den Erlenmeyer-Kolben entnommen und getrocknet und dann weiter untersucht.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode zur Untersuchung der Kollagenstruktur und deren Zusammenhang mit der Ablagerung von kristallinem Calciumphosphat ist die Methode der Röntgenographie. Sie gibt uns Auskunft über die Ordnung der elementaren Bauteile, in diesem Falle der kollagenen Fasern, ihre Aussagen gelten also für die submikroskopischen Größenbereiche, in den

Anteilen von wenigen $\text{\AA}$ bis zu einigen Hundert $\text{\AA}$. (Die Röntgenbeugung im

- a) Rahmen normaler Beugungswinkel erfaßt Bereiche von einigen $\text{\AA}$ -Einheiten.
- b) Kleinwinkelbereich ermöglicht Aussagen über Abschnitte für mehrere Hundert $\text{\AA}$ (HÖHLING und PFEFFERKORN 1965).)

Der dieser Methode zugrunde liegende Vorgang ist folgender: Man läßt Röntgenstrahlen einer gewissen Wellenlänge durch das Untersuchungsobjekt von kristallinem oder kristallähnlichem Aufbau hindurchtreten. Dann ergibt sich an den Gitterebenen des Kristalls ein Beugungsspektrum, welches auf einem Film oder einer Photoplatte als Diagramm aufgezeichnet werden kann. Aus diesem Diagramm werden Anordnung und Abstand der Atome oder Atomgruppen berechnet.

Bei Durchstrahlung von Fasern wie Fibrin, Seide oder Kollagen senkrecht zu ihrer Faserlänge ergeben sich die sogenannten Faser-Diagramme. Auch sie ermöglichen einen Rückschluss auf den Aufbau des betreffenden Faserstoffes.

Die Methode der röntgenographischen Strukturuntersuchung sei an folgendem Bild erklärt (nach Abbildung 1 aus HARTMANN, GATTOW, FRICKE 1957):

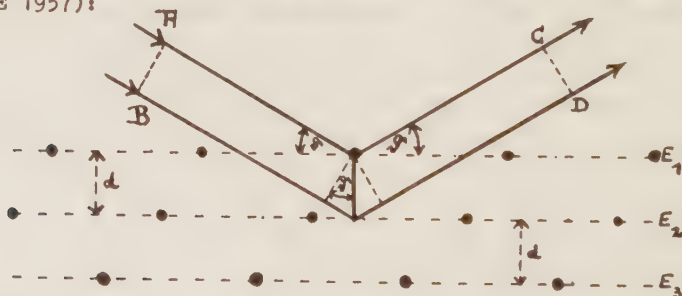


Bild 1: Schematische Darstellung der Beugung von Röntgenstrahlen in einem Kristall

Die Reflexe bei der ursprünglichen Methode von LAUEs werden bewirkt bei echtem kristallinem Material durch Beugung des Röntgenstrahles an den Netzebenen eines wirklichen Kristalles; man spricht von sog. Pulverdiagrammen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem untersuchten kollagenen Fasermaterial (so auch bei vielen anderen organischen Stoffen, z.B. Fibrin) um keine echten Kristalle, sondern um kristallähnliche Stoffe. Diese bezeichnet man als "Parakristalle" (HARTMANN, GATTOW, FRICKE 1957, DAHMEN und HÖHLING 1962), denn hier sind die Maße und Abstände, die die Abmessungen der sog. "Elementarzelle" bestimmen, größeren Schwankungen unterworfen als z.B. bei den gut kristallisierten Salzen (wie NaCl, Pyrit oder SiO_4). Die kollagene Fibrille muß als ein solcher Parakristall in ihrem röntgenographischen Verhalten gelten, da bei ihr vor allem die senkrecht zur Faserichtung stehenden Gitterabstände gewissen Schwankungen unterworfen sind.

Das Verhalten der Röntgenstrahlen an einem Kristallgitter wird erklärt durch die BRAGGSche Interferenzbedingung: Trifft ein enges, paralleles Bündel von Röntgenstrahlen (AB im Bild) auf einen Kristall oder auf eine organische Substanz mit gesetzmäßig sich wiederholendem Aufbau unter einem bestimmten Winkel ϑ , so werden die Röntgenstrahlen am Kristallgitter gebeugt, falls der Gangunterschied zwischen den von den aufeinanderfolgenden Netzebenen reflektierten Strahlen ein ganzes Vielfaches der Wellenlänge beträgt (HARTMANN, GATTOW, FRICKE 1957).

Daraus ergibt sich die BRAGGSche Gleichung:

$$2d \cdot \sin \vartheta = n \cdot \lambda$$

(d = der Abstand der Netzebenen voneinander

ϑ = der Winkel zwischen dem einfallenden Strahlenbündel und der jeweiligen Netzebene

λ = Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung

n = ganze Zahlen (1,2,3...))

Die abgebeugten Röntgenstrahlen (CD im Bild) werden auf einem Film aufgefangen, wo sie ein charakteristisches Muster hinterlassen.

Röntgenographische Kristallstrukturuntersuchungen können nun vorgenommen werden

1. nach dem LAUE-Verfahren (bei fixiertem Kristall wird polychromatisches Röntgenlicht verwandt) oder
2. es wird monochromatisches Röntgenlicht benutzt (Röntgenstrahlen einer definierten Wellenlänge, die kleiner ist als die zu erwartenden Netzebenenabstände - meist zwischen 0,2 und 2,5 Å; HARTMANN, GATTOW, FRICKE 1957. Der Gesamtbereich des Röntgenlichtes liegt zwischen etwa 0,1 Å und 10 Å; MÜNZENBERG und GATTOW 1963) und der Kristall wird bewegt, (Drehkristall-Verfahren) oder man arbeitet mit einem feinen Kristallpulver (DEBYE - SCHERRER-Methode). Diese zweite Methode benutzten wir in unseren Untersuchungen.

Die Lage der auf dem Film auftretenden Beugungsreflexe und die Lage der Reflexe zueinander machen es möglich, die Netzebenenabstände und daraus die Größe der Elementarzelle zu berechnen. Zum zweiten läßt sich aus der Intensität der verschiedenen Reflexe auf den atomaren bzw. molekularen Aufbau der Elementarzelle schließen.

Bei unseren Untersuchungen wurde mit monochromatischer Röntgenstrahlung von der Wellenlänge $\lambda = 1,54 \text{ Å}$ (Kupferstrahlung) gearbeitet unter Benutzung eines zylindrisch gebogenen Filmes, wobei sich in der Achse des Zylinders die ausgerichtete Sehnenfaser befand (Pulverkamera nach DEBYE - SCHERRER).

Wie bereits erwähnt, erhält man bei der Untersuchung von kollagenem Gewebe sog. "Faserdiagramme". Hierbei entstehen die Reflexe nicht, wie bei echtem kristallinem Material durch Beugung des Röntgenlichtes an den Netzebenen eines Kristalles, sondern sie kommen zustande - je nach dem organischen Material - durch Beugung der Strahlen an im gleichen Abstand parallel verlaufenden Kettenmolekülen und an periodisch wiederkehrenden Baugruppen (Atom - oder Molekülgruppen), die als Identitätsperioden bezeichnet werden.

(Wir danken Herrn Dr. M. GEBHARDT, Mineralogisches Institut der Universität Bonn, für seine außerordentlich wertvolle Hilfe bei der Herstellung und Auswertung unserer Kollagen-Röntgenbilder.)

Dazu gibt HOSEMANN (1952) an, daß für die Identitätsperiodik in der Faserlängsrichtung (longitudinale Identitätsperiodik) von ca. 650 Å die Schwankung nur 0,6 % beträgt, für die transversalen Identitätsperioden von 10 - 11 Å aber 15 %. Zusätzlich ist nach HOSEMANN die statistische Richtungsschwankung um die longitudinale und transversale Faserachse bei der Transversalen größer (= 7 %) als bei der Longitudinalen (= 0,3 %) was die starke sichelförmige Ausziehung der äquatorialen Reflexe beim Kollagen verursacht.

Es sei noch betont, daß das Ergebnis einer solchen röntgenographischen Untersuchung praktisch eine Aussage über einen größeren Strukturbereich des untersuchten Stoffes ergibt. Bei einem licht- oder auch elektronenmikroskopischen Präparat kann man dagegen nur eine Aussage über eine ganz bestimmte Stelle machen, nämlich über den Bereich, der mit der Schichtdicke des mikroskopischen Schnittes gegeben ist. Anhand der folgenden Bilder wird gezeigt, wie die einzelnen Reflexsicheln- bzw. Linien mit den Strukturmerkmalen (den Ordnungszuständen) eines Faserstoffes, wie z. B. von kollagenem Gewebe, in Einklang stehen.

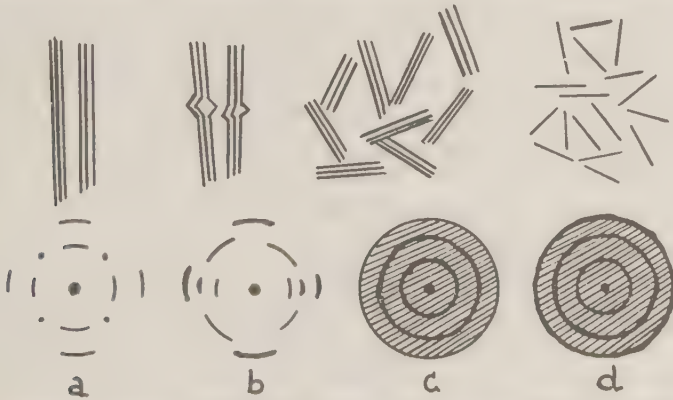


Bild 2a - d (nach HARTMANN 1960) Ordnungszustände mit den dazu-gehörigen stark schematisierten Diagrammen. a) kristalline Ordnung, b) partielle Unordnung, c) mesomorphe Ordnung, d) totale Unordnung

Zur Erklärung zu dem Bild sei noch gesagt, daß die Bezeichnungen Meridian und Äquator wie bei Landkarten aufzufassen sind, nur hier natürlich auf den Röntgenfilm übertragen. Äquatoriale Textur heißt also, daß sich die Röntgenbeugungslinie nur sichelförmig um den Äquator ausdehnt.

Nach den Untersuchungen von HARTMANN, GATTOW, FRICKE 1957, HARTMANN 1960, DAHMEN und HÖHLING 1962, RAMACHANDRAN 1961, MÜNZENBERG und GATTOW 1963, sowie HÖHLING und PFEFFERKORN 1965 sind für die Faserstruktur des Kollagens folgende Verhältnisse im Strukturdiagramm aufgeklärt worden:

Äquatoriale Reflexe: Hier finden sich ein bei $10,55$ - bzw. $11,0$ Å liegender Reflex sowie ein Reflex bei $4,45$ bzw. $4,5$ Å. Nach allgemeiner Ansicht dieser Autoren sind das Reflexe, die durch die gleichmäßig wiederkehrenden Abstände von Polypeptidkette zu Polypeptidkette, bzw. von Helix zu Helix, bedingt sind. Bei einigen Autoren werden die Reflexe auch bezogen auf die Natur der Seitenketten und auf die Abstände der Faserachsen voneinander.

Nach HARTMANN, GATTOW, FRICKE besteht noch ein äquatorialer Reflex bei $5,5$ Å, bei $3,55$ Å sowie ein weiterer Reflex bei $2,15$ Å. Der letztere ist nach ihrer Meinung auf die in der elementaren Kollageneinheit in allen Richtungen anzunehmenden Wasserstoffbindungen zu beziehen. Der Reflex ist schwach und ringförmig, was erklärt wird durch die ubiquitären H-Bindungen.

Meridionale Reflexe (sie entsprechen Identitätsperioden entlang der Faserachse):

$5,3$ Å, bzw. bei anderen Autoren $5,8$ Å
 $2,64$ Å oder ein Reflex, der zwischen $2,85$ bis $2,9$ Å gefunden wurde. Dieser Reflex soll bewirkt werden durch den auf die Faserachse projizierten Abstand von Aminosäureestfolgen, ($\text{C}^{\alpha}-\text{CO}-\text{NH}\dots$).
Diagonale (schrägverlaufende) Reflexe werden von einem Teil der Autoren bei $6,8$ Å oder $7,1$ Å angegeben. Sie sollen "mit der Helixstruktur zusammenhängen, wodurch beim Kollagen bestimmte Identitätsabstände entlang der Spirallinie mit einer Neigung gegen die Faserachse gesehen werden müssen, die der Steigung der Schraube in Projektion auf die Symmetrieachse (Schraubenachse) entspreche.

Die Verwindung dreier Peptidketten miteinander bringt es mit sich, daß die Identitätsperioden entlang der einzelnen Peptidketten nicht immer streng nebeneinander, sondern teilweise auch schräg übereinander zu liegen kommen" (HARTMANN, GATTOW, FRICKE 1957).

Neben der bereits beschriebenen Lösung, die ein Calcium · Phosphat-Produkt von umgerechnet 50 mg % enthält, wurde in unseren Versuchen zur Überprüfung der Pyrophosphat-Eigenschaften eine Natrium-Metaphosphat-Lösung benutzt (sie wurde als 1%ige bzw. 2%ige Lösung der Basislösung und der Inkubationslösung zugesetzt). Nach PRZYBILKA (1967) findet im Organismus eine stete Umlagerung von Pyrophosphat und Metaphosphat und Orthophosphat statt, so daß wir für unsere Versuche Natrium-Metaphosphat (GRAHAM's Salz) benutzen.

GRAHAM's Salz ist ein Gemisch, das neben ringförmigen Metaphosphaten vor allem ringförmige Polyphosphate enthält (PRZYBILKA 1967).

Mit den in unseren Versuchen verwendeten Konzentrationen von 1% bzw. 2% Natrium-Metaphosphat befinden wir uns über der für eine Inhibitor-Wirkung geforderten 10^{-6} M-Konzentration (FLEISCH und NEUMAN 1962), (FLEISCH 1966).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden den einzelnen Versuchslösungen auf 48 ml Basis- und Inkubationslösung je 2 ml der 1%igen bzw. 2%igen Natrium-Metaphosphatlösung hinzugesetzt und in diese Lösungen dann auch wie bei den übrigen Versuchen die vorher präparierten Sehnenfasern eingebracht. Auch das weitere Vorgehen war das gleiche wie bereits oben beschrieben. Nach entsprechender Verweildauer im Brutschrank wurden auch die mit Natrium-Metaphosphat inkubierten Sehnenfasern getrocknet und dann röntgenographisch untersucht.

Die röntgenographischen Strukturuntersuchungen sollten 2 Punkte klären:

1. Finden sich nach Inkubation von kollagenem Fasermaterial in entsprechenden, Calcium- und Phosphat-Ionen enthaltenden Lösungen, kristalline, mineralische Abscheidungen von Hydroxylapatit oder anderen Calcium- und Phosphat-haltigen anorganischen Kristallen? Welche Arten von Mineralien lassen sich gegebenenfalls identifizieren?
2. Trifft es zu, daß eine Nukleation von anorganischen Kristallen auf Kollagen zu verhindern ist durch Anwesenheit von anorganischen Polyphosphaten (Pyrophosphat bzw. Natrium-Metaphosphat)?

3) E r g e b n i s s e

Orientierte Präzipitation von kristallinen Calciumphosphaten auf präparierten Rattenschwanzsehn

Die röntgenographischen Untersuchungen an den kollagenen Fibrillen von Rattenschwanzsehn, die in entsprechender Weise präpariert wurden und dann in die - im Kapitel Methode beschriebene - Inkubationslösung eingebracht wurden, brachten folgende Ergebnisse:

Bei a l l e n untersuchten Fasern war immer eindeutig das Strukturmuster des Kollagens zu erkennen mit den folgenden d-Werten (Identitätsperioden):

meridional	9,55 Å
	3,97 Å
	2,86 Å
äquatorial	11,6 Å
	5,7 Å
	4,6 Å

(nach NYBURG 1961; siehe auch MÜNZENBERG und GATTOW 1963)

Diese Werte entsprechen völlig den von anderen Autoren gefundenen d-Werten (Identitätsperioden) für kollagene Fibrillen.

(NYBURG 1961, HARTMANN, GATTOW, FRICKE 1957, 1961, DAHMEN und HÖHLING 1962, HÖHLING 1966, AMBADY 1959, SANTHANAM 1959)

Wurden die Kollagenfasern nach der entsprechenden Vorbehandlung für eine unterschiedlich lange Zeit (maximal für 16 Tage) in der Lösung inkubiert, welche gelöstes Calcium und Phosphat mit einem Ionenprodukt von 50 mg% enthielt, dann ergaben die Röntgenbilder Reflexe, die das Kollagenmuster zum Teil überlagerten. Diese Reflexe zeigten die in der folgenden Tabelle aufgeführten Glanzwinkel mit entsprechenden Identitätsperioden (d):

Tabelle der d-Werte in den mit Calcium und Phosphat-Lösung behandelten kollagenen Fasern:

d	d	Reflex- stärke	Mineral
5,8	7,62	s (schwach)	Brushit
10,3	4,31	s	Brushit
11,5	3,86	m (mittel)	Brushit/Apatit
13,0	3,42	st (stark)	Apatit/Brushit
14,3	3,12	st	Brushit/OCP
15,8	2,83	st st	
19,5	2,31	st	Apatit
21,5	2,20	m	OCP

Die gefundenen Werte bestätigen eindeutig das Vorhandensein von Hydroxylapatit und Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Die Existenz von Octocalciumphosphat an den Sehnen ist äußerst wahrscheinlich, nicht aber absolut sicher, da der Reflex von $d=3,12 \text{ \AA}$ mit dem von Brushit zusammenfiel und da der Reflex bei $d=2,20 \text{ \AA}$ nicht eindeutig genug ist, um daraus das Vorhandensein von Octocalciumphosphat abzuleiten.

In allen den untersuchten Fasermustern war also das in der Inkubationslösung in gelöster und ionisierter Form vorhandene Calcium und Phosphat als anorganisches, minerales Calciumphosphat dreier verschiedener Kristallisationsformen (Brushit, Octocalciumphosphat und Hydroxylapatit) abgelagert worden.

Bei den kollagenen Fasern, die in einer Lösung inkubiert waren, die zusätzlich zu dem gelösten Calcium und Phosphat noch Metaphosphat (GRAHAM's Salz) als 1- bzw. 2%ige Lösung enthielt, fanden sich keinerlei Ablagerungen von kristallinem Calciumphosphat. Es fand sich lediglich das reine Kollagenmuster mit den eben genannten d-werten (siehe Tabelle: d-Werte des Kollagens). Obwohl hier Calcium und Phosphat im gleichen Wert von 50 mg% vorhanden waren, hatte durch den Zusatz von je 2 ml Natrium-Metaphosphat-Lösung zu je 48 ml Basis- und Inkubationslösung (Verhältnis 1:24) eine Verhinderung der Ablagerung von kristallinem Calciumphosphat in jeglicher Form stattgefunden.

4) Besprechung der Ergebnisse

Für die Vorgänge bei der Ablagerung von anorganischem Calciumphosphat auf organischen Geweben, z.B. bei der normalen Knochenverkalkung, bei der Verkalkung von Sehnen oder Bändern, oder bei heterotopen Kalkablagerungen in anderen Anteilen des Bindegewebes (z.B. Myositis ossificans, MÜNZENBERG 1967) werden zur Deutung epitaktische Gesichtspunkte herangezogen.

Epitaxie ist das gesetzmäßige und strukturabhängige Verwachsen zweier kristalliner oder subkristalliner Individuen, bedingt durch weitgehende, ein- oder zweidimensionale Analogien im Gitteraufbau dieser Kristallindividuen. In der Osteologie wird durch epitaktische Vorgänge die Abscheidung von anorganischen Mineralien auf kollagene Fasern erleichtert, was auch zur Erklärung der Vorgänge bei der Knochenmineralisierung dienen kann (hierbei werden Calciumphosphat-Mineralen als anorganischer Gast auf den kollagenen Fasern = dem Träger abgelagert).

Die vorliegenden Untersuchungen sollten die Richtigkeit dieser Zusammenhänge bestätigen, und Auskunft geben über den Ablauf der Mineralabscheidung auf kollagenen Fibrillen.

In Untersuchungen von MÜNZENBERG und GEBHARDT war festgestellt worden, daß der Knochen keine monomineralische Phase darstellt. Es konnte vielmehr gezeigt werden, daß im Knochen neben dem Hauptbestandteil, der die Strukturcharakteristika von Apatit zeigt, auch Brushit und Octocalciumphosphat vorliegen. Es war nun interessant zu wissen, ob bei der epitaktischen Mineralabscheidung diese Minerale auch nachweisbar waren.

NEUMAN und NEUMAN stellten in einer Reihe von Experimenten fest, daß Kollagen in der Lage ist, die Abscheidung von Calciumphosphat-Mineralen zu erleichtern. In reinen Calciumphosphat-Lösungen war ein Calcium · Phosphat-Produkt von mindestens 50 mg% notwendig, bei einer Inkubation von 3 Tagen, um eine erstmalige Ausfällung von Kristallen zu bewirken, während bei Anwesenheit von Kollagen der sog. FP-Wert (FP = formation product, das kleinste Ionenprodukt von Calcium und Phosphat in mg% ausgedrückt, welches notwendig ist zur initialen Kristallbildung) bei

15,9 mg% liegt, also erheblich erniedrigt ist. Nach den beiden genannten Autoren stellt das Kollagen eine Abscheidungsbasis, den organischen Träger, für Calciumphosphat-Kristalle als Gastsubstanzen dar. Es erleichtert also die Mineralkeimbildung, ähnlich einem Katalysator.

Wir fanden in unseren Versuchen tatsächlich, daß die Nukleation von Calciumphosphat-Mineralen durch kollagene Fasern durch das Eintauchen in Lösungen, die die jeweiligen Ionen enthielten, erleichtert wurde.

Auf den inkubierten kollagenen Fasern fand sich aber nicht nur - wie zunächst erwartet - Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). FLEISCH und NEUMAN (1960, 1961) sprechen bei ihren Versuchen von Hydroxylapatit, welcher das Ergebnis der Abscheidung von Calciumphosphat-Kristallen in ihren Versuchen darstellt; es wird jedoch bei ihnen nicht erwähnt, wie nachgewiesen wurde, daß es sich bei den Calciumphosphat-Mineralen tatsächlich um Hydroxylapatit handelt, so daß dieser Punkt leider unklar blieb.

Bei der Auswertung unserer Versuche fanden sich neben den d-Werten des Hydroxylapatits außerdem kristalline Ablagerungen von Brushit ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) sowie wahrscheinlich von Octocalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$).

Brushit also kann durchaus in Verbindung mit Kollagen bei einem mehr alkalischen Wert als pH 6,2 - 6,9 existieren.

Es ist also durchaus so, wie vermutet, daß der Abscheidungsprozess sich in Stufen vollzieht.

Zunächst muß aus energetischen Gründen Brushit, dann Octocalciumphosphat abgeschieden werden, aus beiden Mineralen könnte durch Umkristallisation dann Apatit entstehen. Unsere in vitro-Versuche zeigen aber, daß nicht nur in vivo die Apatitbildung in Stufen vor sich geht.

Brushit ist ein gelblich-weißes Mineral, das in seiner Struktur dem Gips sehr ähnlich ist. Es besitzt den Härtegrad 2 in der Härteskala von MOHS, ist also mit dem Fingernagel noch geradritzbar. Diese Eigenschaft zeigt, daß das Brushit für die Stabilität eines Knochens keine Rolle spielen dürfte. Es müßte im Organismus eine andere Bedeutung haben.

Unserer Meinung nach kann man dem Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) im menschlichen Organismus zwei Bedeutungen zuweisen:

Erstens also hat Brushit eine mineralogische Bedeutung. Brushit ist wichtig als Durchgangsstufe zum Octocalciumphosphat und zum härteren Apatit, denn mineralogisch läßt sich ein Mineral aus gelösten Komponenten viel leichter bilden, wenn es über Zwischenstufen hinweg gebildet wird. Es ist energetisch sehr viel schwerer, von gelöstem Calcium und Phosphat sofort zu Hydroxylapatit zu kommen, als von Calcium und Phosphat über Brushit und über Octocalciumphosphat zu Hydroxylapatit. Auch dann ist die Bildung über Zwischenstufen noch viel leichter, wenn dabei der Gitterbau geändert werden muß (Brushit = monoklines Gitter, Hydroxylapatit = hexagonales Gitter).

Zweitens muß man dem Brushit auch eine spezielle physiologische Bedeutung im menschlichen Organismus zuerkennen.

Brushit ist leichter löslich als Hydroxylapatit oder auch als Octocalciumphosphat. Beim Brushit sind die einzelnen Atome in ihrem Gitter viel geringer gebunden als z.B. die Atome im Apatit-Gitter, d.h. die einzelnen Schwingungen der Atome um ihre Ruhelage sind beim Brushit viel größer und die Atome können daher viel leichter aus ihrem Verband herausgerissen werden als beim Hydroxylapatit. Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) hat also eine geringere Bindungsenergie als das Octocalciumphosphat oder gar der Hydroxylapatit.

Physiologisch hat das die Bedeutung, daß Schwankungen des Serumspiegels von Calcium oder Phosphat durch Brushit viel leichter und schneller ausgeglichen werden können als durch Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Dieses Knochenmineral ist zwar löslich, aber längst nicht so schnell wie Brushit. Das "Reservedepot" Brushit ist also leichter angreifbar als das "Reservedepot" Hydroxylapatit.

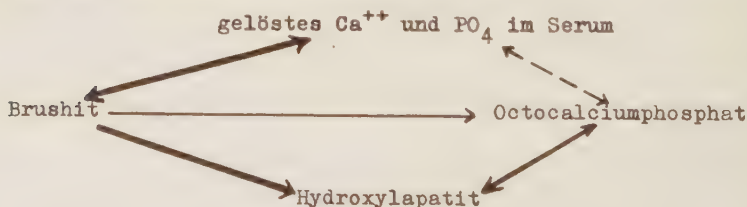
Man kann annehmen, daß Brushit im jüngeren Knochen häufiger vorkommt, weil es eine Zwischenstufe darstellt. Im jugendlichen Organismus ist die Schwankungsmöglichkeit des Calcium- und Phosphatspiegels viel größer als im alten, ausgewogenen Organismus.

Wenn ein Körper sich noch im Wachstum befindet, also auch der Knochen noch wächst - auch im Alter spielen sich im Knochen stete Auf- und Umbauvorgänge ab, aber doch in geringerem Maße als in der Jugend -, dann verbraucht junger, wachsender Knochen viel mehr Calcium und Phosphat-Ionen.

Brushit ist also in beiden Richtungen schnell verfügbar (als Durchgangsform zum Octocalciumphosphat und zum Hydroxylapatit und quasi als Puffersubstanz zum Abfangen von Calcium- oder Phosphat-Schwankungen im Serum) und es dient zur Stabilisierung des Blut-Calcium-Spiegels von 5 mÄq/l (OVERZIER 1968), der ja vom Körper außerordentlich konstant gehalten wird (Werte über 11 mg% sind schon sicher pathologisch und verdächtig z.B. auf einen Hyperparathyreoidismus).

Das Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) kann hier als sehr feine Reglersubstanz wirken und vermutlich gibt es daher auch nicht viel Brushit-Mineral im Körper, speziell im Knochengewebe, denn es wird sehr schnell weiter aufgebaut zu Octocalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) und zu Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$), oder aber wieder abgebaut und darum ist es schwierig, die Substanz Brushit aufzufinden und nachzuweisen. Diese genannten Gründe, die Brushit zu einer Art "Wartezimmer für Calcium- und Phosphat-Ionen" machen, zeigen, daß dem Brushit eine Rolle zukommt, die wichtiger ist, als man es bisher angenommen hat.

Das folgende Schema zeigt die Beziehungen der verschiedenen Calciumphosphat-Mineralen zueinander:



(nach MÜNZENBERG 1968, Habilitation)

Wie im Kapitel "Ergebnisse" beschrieben, verhinderte der Zusatz von Metaphosphat zu einer Inkubationslösung die Ablagerung eines jeglichen Calciumphosphat-Minerales. Das hat sich auf allen unseren Röntgenbildern eindeutig ergeben. Bei diesen Proben mit Metaphosphat-Zusatz sind weder Brushit, noch Octocalciumphosphat, noch Apatit-Ablagerungen vorhanden, sondern allein die Kollagen-Reflexe sind zu erkennen. Alle mit Metaphosphat inkubierten Fasern zeigen das Muster des Kollagens. Das bedeutet, daß in diesen Inkubationslösungen trotz vorhandener Calcium- und Phosphat-Ionen, in der Höhe, wie sie in den anderen Versuchen mineralische Abscheidungen bewirkten, bei vorhandenem Metaphosphat die Ausfällung von Calciumphosphat-Kristallen völlig verhindert wird.

Indem man diese Ergebnisse zusammen mit den anderen bekannten Tatsachen in Einklang bringt, ergibt sich für uns folgende Vorstellung von der Verkalkung von Bindegeweben - in vivo und in vitro:

Wir glauben, daß die kollagenen Fibrillen mit ihrem oben beschriebenen Aufbau als Nukleationsbasis für im Organismus vorhandenes, gelöstes Calcium und Phosphat dienen, dergestalt, daß schon bei physiologischen Konzentrationen beider Elemente durch die nukleierende Wirkung des Kollagens eine Abscheidung von anorganischen Kristallen möglich wird. In den Begriffen der Epitaxie ausgedrückt, heißt das, auf dem Träger (= Kollagen) scheidet sich der Gast oder das Adsorbat (= anorganisches Calciumphosphat) in Form von Kristallen ab. Der Vorgang wird bewirkt durch weitgehende Struktur analogien beider Substanzen in ihrem kristallinen Gitteraufbau.

Tritt Metaphosphat hinzu - im Organismus zumeist als Pyrophosphat - so findet dieses epitaktische Wachstum nicht statt. Metaphosphat verhindert ein epitaktisches Aufwachsen von Kristallen, indem es wahrscheinlich die Gitterabstände des Kollagens besetzt, die als Nukleationspunkte für die Abscheidung von Calciumphosphat-Kristallen (Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Octocalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) oder Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$))

oder mehrere dieser Minerale nebeneinander) wichtig sind.

Für epitaktische Beziehungen zwischen dem Brushit und den kollagenen Fibrillen spricht auch die Tatsache, daß der d-Wert des Brushits bei $3,06 \text{ \AA}$ durch Multiplikation mit 10 einen Wert von $30,6 \text{ \AA}$ ergibt, also einen Wert, der nach RAMACHANDRAN (zitiert bei HÖHLING 1966) eine Helixperiode eines Kollagenmoleküles darstellt und zwischen $28 - 33 \text{ \AA}$ liegen soll.

Metaphosphat und Pyrophosphat bedeckt auf den kollagenen Fibrillen die Nukleationspunkte und verhindert damit ein epitaktisches Wachstum. Diese Auffassung wird gestützt durch die Tatsache, daß in einem Fall von Myositis ossificans (MÜNZENBERG 1967) Natrium-Metaphosphat therapeutisch nicht wirksam war (500 mg Metaphosphat/die), vermutlich, weil zu wenig Metaphosphat gegeben wurde, um rein quantitativ bei allen sich neu bildenden kollagenen Fibrillen eine auftretende Nukleation von Calciumphosphat-Kristallen zu verhindern; mit den verwendeten Mengen wurden gar nicht alle Nukleationspunkte abgedeckt und infolgedessen konnte die pathologische Verkalkung weiter fortschreiten.

Einige Autoren (FLEISCH und NEUMAN 1961) vertreten demgegenüber den Standpunkt, daß Metaphosphat dadurch wirkt, weil es die Nukleationszentren der kollagenen Fibrillen "vergiftet". Nach ihrer Ansicht ist die inhibitorische Wirkung von Pyrophosphat schon bei einer Konzentration von 10^{-6} M deutlich. Diese Ansicht ließ sich bei MÜNZENBERGs Therapie der Myositis ossificans jedoch nicht beweisen oder bestätigen.

Nimmt man den Ablauf der normalen Verkalkung in vivo so an wie wir ihn beschrieben haben, dann taucht eine weitere Frage auf: Warum verkalken dann nicht alle Gewebe, die kollagene Fasern enthalten - Kollagen ist das weitestverbreitete Bindegewebe im menschlichen Körper -? Bei richtiger Beurteilung der bekannten Tatsachen muß diese Frage so beantwortet werden: In den Geweben, die normalerweise verkalken, vor allem im Zahnschmelz und im Knochen, findet sich in genügend hohen Konzentrationen das Ferment Pyrophosphatase (CARTIER und PICARD 1955, PERKINS und WALKER 1958, DULCE 1960). Dieses Ferment zerstört das ebenfalls reichlich

ubiquitär im Körper vorhandene, anorganische Pyrophosphat und nun kann die nach epitaktischen Bedingungen einsetzende Verkalkung der kollagenen Fibrillen ablaufen. FLEISCH (1966) gibt eine Darstellung der häufigsten Theorien zur Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen im Knochengewebe, er sagt jedoch nur sehr wenig über die Wichtigkeit epitaktischer Vorgänge dabei.

In den Geweben, die normalerweise nicht verkalken - Sehngewebe, Bänder usw. (die sog. "Weichgewebe" des Körpers) - fehlt das Ferment Pyrophosphatase oder ist zumindest unwirksam (FLEISCH 1966). Das anorganische Pyrophosphat, welches auch in diesen Geweben vorhanden ist, wird daher nicht durch Spaltung zerstört. Es behält also seine Inhibitor-Eigenschaften und die Nukleation von Kristallen zur Einleitung einer Verkalkung wird wirksam verhindert.

Zusätzlich zu diesem Gesichtspunkt muß nach unserer Meinung jedoch eine weitere Tatsache berücksichtigt werden: die Mucopolysaccharide, die die kollagenen Fibrillen überall in Form der Grundsubstanz umhüllen, üben ebenfalls eine Hemmwirkung auf die Verkalkung von kollagenem Gewebe aus. Durch die Umhüllung der kollagenen Fibrillen werden die periodisch angeordneten Nukleationspunkte auf den einzelnen Fibrillen von den Mucopolysacchariden verdeckt und können ihre eigentliche Wirkung nicht entfalten.

Unsere Auffassung über diese Vorgänge wird auch von GLIMCHER (1960) gestützt. Er vermutet, daß Mucopolysaccharide die Ausfällung von Knochensalzen verhindern und erst depolymerisiert werden müssen, damit es zum Einsetzen einer Verkalkung kommen kann.

Um diese inhibitorische Wirkung der Mucopolysaccharide auszuschalten, haben wir in unseren Versuchen die Zwischensubstanz mit 0,1 nNaOH herausgelöst. So lagen die Nukleationszentren der kollagenen Fibrillen frei und Kristallbildung und Abscheidung konnten ungehindert ablaufen, da die hemmende Wirkung der Mucopolysaccharide damit entfiel.

Es muß jedoch erwähnt werden, daß die Aufgabe der Mucopolysaccharide bei der normalen Verkalkung noch nicht völlig klar ist. Bei

einigen Autoren herrscht sogar die Meinung, daß die Mucopolysaccharide notwendig sind, damit eine Verkalkung stattfinden kann. (SOBEL, BURGER, NOBEL 1960) Wir halten jedoch diese Meinung für unrichtig.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Ist Kollagen in seiner Struktur erhalten, dann begünstigt es in einer Calciumphosphatlösung die Kristallbildung von Brushit und Hydroxylapatit. Wahrscheinlich bildet sich bei diesem Präzipitationsvorgang auch Octocalciumphosphat. Dieser auf Epitaxie beruhende Vorgang gelingt erst dann, wenn die kollagenen Fasern durch eine milde Lauge vorbehandelt worden sind. Durch die Denaturierungsvorgänge an den Mucopolysacchariden werden die spezifischen Gitterabstände an den kollagenen Fasern freigelegt, und dann erst wird eine strukturabhängige Substanzabscheidung von Calciumphosphaten auf dem Kollagen möglich.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen die bereits früher gemachte Beobachtung, daß Brushit auch bei einem pH-Wert von 7,5 bis 7,9 in Verbindung mit Kollagen existenzfähig ist. Von NEUMAN und NEUMAN wurde das angezweifelt. Wenn es im Knochen gefunden wird, dann muß es also nicht unbedingt ein Auflösungsprodukt des Apatits sein, sondern kann durchaus die erste Phase beim gesamten Präzipitationsvorgang darstellen.

Durch Natriummetaphosphat wird eine jede Mineralabscheidung auf den kollagenen Fasern verhindert, wahrscheinlich dadurch, daß Metaphosphat bestimmte Strukturabstände des Kollagens besetzt und dadurch eine orientierte Substanzabscheidung unmöglich macht.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s :

- 1 - Ambady, G. K. - Studies on Collagen. III. Oriented Crystallisation of Inorganic Salt on Collagen
Proc. Indian Acad. Sci. A 49, 136 (1959)
- 2 - Ascenzi, A. - Die Knochengewebestruktur untersucht mit dem Elektronenmikroskop
Sci. ital. 8, 701-730 (1955)
- 3 - Ascenzi, A. und Bonucci, E. - The Osteon Calcification as Revealed by the Electron Microscope,
p. 142-146
in: H. Fleisch, H.J.J. Blackwood and M. Owen (eds.), Calcified tissues 1965, Springer
- 4 - Banga, I., J. Balo, and D. Scaro - Collagen mucoproteinase and other collagenases
Acta physiol. Acad. Sci. Hung. 19, 19-26 (1961)
- 5 - Bargmann, W. - Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
6. Aufl., 1967
- 6 - Bassett, C.A.L. - Current Concepts of Bone Formation
J. Bone Jt. Surgery A 44, (1962), 1217-1244
- 7 - Bassett, C.A.L. - Electro-mechanical Factors Regulating Bone Architecture
p. 78-89
in: H. Fleisch, H.J.J. Blackwood and M. Owen (eds.), Calcified tissues 1965, Springer
- 8 - Bassett, C.A.L. - Electrical effects in Bone
Sci. Amer. 213 (1965), 18-25
- 9 - H. Becher, G. Hoegen und G. Pfefferkorn - Sublichtmikroskopisch-morphologische Untersuchungen des anorganischen Knochenanteiles
Acta anat. (Basel), 20, 105-115 (1954)
- 10 - G. Beneke und W. Sandritter - Morphologische Veränderungen bei Bindegewebskrankheiten
Die Medizin. Welt, 11 (1968), S. 675-682

- 11 - Brauns, R. und K.F. Chudoba - Allgemeine Mineralogie
Samml. Götschen, Berlin 1968
- 12 - Brauns, R. und K.F. Chudoba - Spezielle Mineralogie
Samml. Götschen, Berlin 1964
- 13 - Bucher, R. und R. Straumann - Die Bedeutung der kristallinen
Struktur der kollagenen Faser für die norma-
le und pathologische Kalkpräzipitation
Schweiz. Med. Wschr. 67 (1937), 619-622
- 14 - Buckley, H.E. - Crystal growth
John Wiley and Sons Inc., New York-London
1961
- 15 - Buehrer, T. und Reitemeyer, R. - J. Physiol. Chem. 44 (1940)
S. 535
zit. nach H. Fleisch und S. Bisaz (35)
- 16 - Carlström, D. - X-ray crystallographic studies on apatites
and calcified structures
Acta radiol. (Stockholm), Suppl. 121 (1955)
- 17 - Carlström, D. und A. Engström - The Influence of Collagen
on the Organisation of Apatite Crystalites
in Bone,
p. 85-88
Symp. Soc. Exp. Biol. 9 (1955)
- 18 - Cartier, P. und J. Picard - La minéralisation du cartilage
ossifiable. IV. La signification de la
réaction ATPasique
Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 37, 1169-1176
(1955)
- 19 - Dahmen, G. und H.J. Höhling - Submikroskopische Untersu-
chungen an gesunden und degenerierten Me-
nisci
Zschr. f. Orthop. u. d. Grenzgeb. 96/1, 7
(1962)
- 20 - Dallemagne, M.J. - Le Calcium dans Le Squelette et Les
Dents
in: Z. M. Bacq (ed.), Handbuch der experi-
mentellen Pharmakologie, Bd. 17/2, S. 273-

- 482, Springer Verl. 1964
- 21 - Dallemagne, M.J. und L.J. Richelle - Le Tissu Osseux:
Structure Et Metabolisme
La Presse Medicale 73, (1965), No. 33
 - 22 - Dulce, H.J. - Zur Biochemie der Verknöcherung. II. Enzym-
aktivitäten im hyalinen Knorpel, im verknö-
chernden Knorpel und im Knochen
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 319 (1960)
S. 272-278
 - 23 - Dulce, H.J. - Zur Biochemie der Verknöcherung. III. Mine-
ralgehalt, Grundsubstanz, -zusammensetzung
und Enzymaktivitäten im Callusgewebe und in
rachitischen Knochen von Ratten.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 320 (1960),
S. 1-10
 - 24 - v. Ebner, V. - Sind die Fibrillen des Knochengewebes ver-
kalkt oder nicht?
Arch. mikr. Anat. 29, 213-236 (1887)
 - 25 - Fitton Jackson, S. - Fine Structure of developing bone in
the embryonic fowl
Proc. Royal Soc. B 146 (1957)
 - 26 - Fitton Jackson, S. - Connective Tissue Cells, p. 387 in:
J. Brachet und A. Mirsky (eds.), The Cell VI
New York, Academic Press 1964
 - 27 - Fitton Jackson, S. and Smith, R.H. - Fibrogenesis of Connec-
tive and Skeletal Tissues in the Embryonic
Fowl
Symp. Soc. Exp. Biol. 9 (1955), p. 89-95
 - 28 - Fitton Jackson, S. and Randall, J.I. - Fibrogenesis and the
Formation of Matrix in Developing Bone
Ciba Foundation Symp. on Bone Structure and
Metabolism, 1956, p. 47-64
 - 29 - Fitton Jackson, S. - Fibrogenesis and the formation of Ma-
trix
in: K. Rohdahl, J.T. Nicholson and E.M. Brown
(eds.), Bone as a tissue, p. 165-185,

New York, Mc Graw-Hill Book Co. 1960

- 30 - Fleisch, H. - Neue Gesichtspunkte der Kalkablagerung
Schweiz. Med. Wschr. 29, S. 858 (1961)
- 31 - Fleisch, H. - Role of Nucleation and Inhibition in
Calcification
Clin. Orthop. 32, (1964), p. 170
- 32 - Fleisch, H. - Physiologie und Biochemie der Knochenbil-
dung
Klin. Wschr. 7, (1966), s. 360-363
- 33 - Fleisch, H. und Bisaz, S. - Mechanisms of Calcification:
Inhibitory Role of Pyrophosphate
Nature (London) 195, (1962), p. 911
- 34 - Fleisch, H. und Bisaz, S. - Isolation from urine of pyro-
phosphate, a calcification inhibitor.
Amer. J. Physiol. 203, (1962), 671-675
- 35 - Fleisch, H. und Bisaz, S. - Übersicht, Pathophysiologie und
Therapie der Urolithiase
Zschr. f. Urol. Bd. 59, H. 11 (1966), 785
- 36 - Fleisch, H. und W.F. Neuman - On the role of phosphatase
in the Nucleation of Calcium Phosphate by
Collagen
J. Amer. Chem. Assoc. 82 (1960), p. 3783
- 37 - Fleisch, H. und W.F. Neuman - Mechanisms of Calcification:
role of collagen, polyphosphates and phos-
phatase
Amer. J. Physiol. 200, (1961), p. 1296
- 38 - Glimcher, M.J. - Molecular Biology of mineralized tissues
with particular Reference to bone
Rev. mod. Phys. 31 (1959), p. 359
- 39 - Glimcher, M.J. - Specificity of the molecular structure of
organic matrices in mineralization
in: R.F. Sognnaes (ed.), Calcification in
Biological Systems, p. 421
Am. Ass. Adv. Sci., Washington 1960

- 40 - Glimcher, M.J. und Hodge, A.J. and Schmitt, F.O. - Macromolecular Aggregation States in Relation to Mineralization: The Collagen-Hydroxyapatite System as studied in vitro
Proc. Nat. Acad. Sci. 43 (1957), p. 860
- 41 - Glimcher, M.J. and Krane, S.M. - The Identification of Serine Phosphate in enamel proteins
Biochim. Biophys. Acta 90 (1964), p. 477
- 42 - Goldenberg, H. and Sobel, A.E. - Calcification IX: Influence of Alkaline Earths on Survival of the Calcifying Mechanism
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81 (1952), p. 695
- 43 - Hamerman, D. and M. Schubert - Diarthroidal joints, an essay
Amer. J. Med. 33, (1962), p. 555
- 44 - Hartmann, F., G. Gattow und R. Fricke - Untersuchungen über die Struktur und Funktion des Bindegewebes
4. Mitteilung-Röntgenstrukturuntersuchungen an der Rattenschwanzsehne unter normalen und pathologischen Bedingungen
Zschr. f. Rheumaforsch. 16 (1957), S.243-259
- 45 - Hartmann, F. - Bindegewebsveränderungen bei pathologischen Zuständen
II. Symp. Med. Univ. Klin. Münster 16./17.10. 1959
G. Thieme Verl., Stuttgart 1960
- 46 - Hass, G.M. - Studies of cartilage IV. A morphologic and chemical analysis of aging human costal cartilage
Arch. Pathol. 35, 275-284 (1943)
- 47 - A.F. Hollemann - E. Wiberg - Lehrbuch d. anorgan. Chemie
57. - 70. Aufl. 1964
- 48 - Höhling, H.J. - Die Bauelemente von Zahnschmelz und Dentin aus morphologischer, chemischer und struktureller Sicht
Habilitationsschrift d. Med. Fak. d. Univ. Münster 1966, Carl Hanser Verl. München 1966

- 49 - Höhling, H.J. und G. Pfefferkorn - Biokristallographische Untersuchungen zur strukturellen Veränderung an degenerierten menschlichen Sehnen
Zschr. f. Orthop. 100, (1965), S. 462-470
- 50 - Knese, K.H. - Ultrastruktur des Knochengewebes
Dtsche. Med. Wschr. 84 (1959), 36:1640
- 51 - Krane, S.M. and Glimcher, M.J. - Protein phosphorous and phosphokinase in connective tissue
in: H. Fleisch, H.J.J. Blackwood and M. Owen (eds.), Calcified tissues 1965, Springer
Verl. Berlin 1966
- 52 - Kuhnke, E. - Sehnen
Dtsche. Med. Wschr. 86 (1961), 36:1731
- 53 - Kühn, K. - Die Struktur des Kollagens
Leder 13 (1962), S. 73-78
- 54 - Kühn, K. - Untersuchungen zur Struktur des Kollagens
Die Naturwissenschaften 5 (1967), S. 101-109
- 55 - Kühn, K. und E. Zimmer - Eigenschaften des Tropokollagen-Moleküls und deren Bedeutung für die Fibrillenbildung
Zschr. f. Naturforschg. 16b (1961), 648-658
- 56 - McLean, F.C. and M.R. Urist - Bone
Chicago, Chic. Univ. Press 1955 and 1961
- 57 - Münzenberg, K.J. - Über die Unwirksamkeit von Metaphosphat bei einem Fall von Myositis ossificans progressiva
Zschr. f. Orthop. u. d. Grenzgeb. 103 (1967), 1. Heft, S. 106-108
- 58 - Münzenberg, K.J. - Untersuchungen zur Kristallographie des Knochenminerals
Habilitationsschrift d. Med. Fak. d.
Univ. Bonn, 1968

- 59 - Münzenberg, K.J. und G. Gattow - Röntgenographische Untersuchungen der Dupuytren'schen Kontraktur und des muskulären Schiefhalses
Arch. f. orthop. u. Unf.-Chir. 55 (1963), 139
- 60 - Neuhaus, A. - Epitaxie
Fortschr. d. Mineral. Bd. 29/30 (1950/51), 136
- 61 - Neuman, W.F. und M.W. Neuman - The chemical dynamics of bone mineral
Chicago, Chicago Univ. Press 1958
- 62 - Nordin, B.E.C. - Hormones and calcium metabolism
in: H. Fleisch, H.J.J. Blackwood and M. Owen (eds.), Calcified tissues, Springer Verl. 1966
- 63 - Nyburg, S.C. - X-Ray Analysis of Organic Structures
New York-London, Academic Press 1961
- 64 - Overzier, C. - Systematik der Inneren Medizin
G. Thieme Verl., Stuttgart 1968
- 65 - Perdok, W.G. - Crystallographic aspects of calcification
Arch. Oral Biol. Proc. 9th Congress of the Europ. Org. f. Res. on fluorine and dental carie prevention
85. Suppl. 1963
- 66 - Perkins, H.R. and P.G. Walker - The occurrence of pyrophosphate in bone
J. Bone Jt. Surg. 40 B, (1958), 333-339
- 67 - Posner, A.S. - The Nature of the Inorganic Phase in Calcified Tissues
in: R.F. Sognnaes (ed.), Calcification in Biological Systems, p. 373-394
Amer. Ass. Adv. Sci., Wash. 1960

- 68 - Przybilka, A. - Natriummetaphosphatinjektionslösung - ein Mittel zur Behandlung von Kalkablagerungen?
Die Krankenhausapotheke 1 (1967), S. 687
- 69 - Ramachandran, G.N. - Structure of Collagen
Nature 177 (1956), p. 710
- 70 - Ramachandran, G.N. - Persönl. Mitteil. Frühjahr 1961 an
H.J. H ö h l i n g - zit. n. Quelle 19
- 71 - Ramachandran, G.N. - The tripel helical structure of collagen. Aspects of Protein Structure
Proceedings of a Symposium held in Madras, 14th-18th January 1963: edited by G.N. Ramachandran, p. 39-55
- 72 - Ramachandran, G.N. and G. Kartha - Structure of Collagen
Nature 174 (1954), p. 269
- 73 - Ramachandran, G.N. and G. Kartha - Structure of Collagen
Nature 176 (1955), p. 593
- 74 - Ramachandran, G.N. and V. Sasisekharan - Structure of Collagen
Nature 190 (1961), p. 1004
- 75 - Reitemeyer, R. and T. Buehrer - The inhibiting action of minute amounts of sodium metaphosphate on the precipitation of calcium carbonate from ammoniacal solutions
J. Phys. Chem. 44 (1940), p. 535
- 76 - Robinson, R.A. and M.L. Watson - Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope
Anat. Rec. 114 (1952), p. 383-409
- 77 - Robinson, R.A. and M.L. Watson - Electron micrography of Bone
Metabol. Inter. 5 (1953), p. 72-104
- 78 - Robinson, R.A. and M.L. Watson - Crystal-collagen relationships in bone as observed in the electron microscope. III. Crystal and collagen morphology as a function of age
Ann. N. Y. Acad. Sci. 606 (1955), p. 596

- 79 - Robison, R. - The significance of phosphoric esters in metabolism
New York, N.Y. University Press 1932
- 80 - Rudy, H. - Altes und Neues über kondensierte Phosphate
J.A. Benokiser (ed.), Ludwigshafen, 1960
- 81 - Santhanam, M.S. - Studies On Collagen IV. Deposition of Inorganic Crystallites on Collagen
Proc. Indian. Acad. Sci. A 49 (1959), p. 210
- 82 - Seatchard, G.J., L. Oncley, J.W. Williams and A. Brown
J. Amer. Chem. Soc. 66 (1944), p. 1180
zitiert n. Quelle 44
- 83 - Seifert, K.F. - Über orientierte Aufwachsungen einfacher Aminosäuren auf Quarz und einigen Schichtsilikaten
Inauguraldissertation, Univ. Münster 1957
- 84 - Seifert, H. - Naturw. Rundschau 14, (I) 7, und 14 (II) 60, 1961
zitiert nach Quelle 48
- 85 - Sobel, A.E., M. Burger and S. Nobel - Mechanisms of nuclei formation in mineralizing tissues
Clin. Orthop. 17 (1960), p. 103-123
- 86 - Solomons, C.C. and W.F. Neuman - On the mechanisms of calcification: the remineralization of dentine
J. biol. Chem. 235 (1960), p. 2502-2506
- 87 - Stranski, I.N. - Zur Theorie des Kristallwachstums
Z-phys. Chemie A 136, 259 (1928)
- 88 - Strates, B. and W.F. Neuman - On the mechanism of calcification
Proc. Soc. exp. Biol. (New York)
97 (1958), p. 688
- 89 - Schmidt, W.J. - Der Feinbau der anorganischen Grundmasse des Knochengewebes
Ber. oberhess. Ges. Natur- u. Heilk.
15 (1933), S. 219-247

- 90 - Schmidt, W.J. - Über homogene und sphäritische Verkalkung
bei den verschiedenen Arten des Knochen-
gewebes
Naturwiss. 34 (1947), S. 273-277
- 91 - Wolpers, C. - Elektronenmikroskopie der Plasmaderivate
Grenzgeb. d. Med. 2 (1949), S. 527-535

L e b e n s l a u f

Am 22. Mai 1942 wurde ich als einziges Kind des damaligen Gendarmerie-Hauptmannes Heinrich Klippe und seiner Ehefrau Dora, geb. Stahl, in Danzig geboren. Vom Jahre 1948 an besuchte ich die Evangelische Volksschule Monschau/Eifel bis zum Jahre 1952. Dann wechselte ich über auf das St. Michael-Gymnasium im gleichen Ort, wo ich dem Neusprachlichen Zweig angehörte. Am 4. März 1961 legte ich dort mein Abitur ab.

Im Sommersemester 1961 begann ich das Studium der Medizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, wo ich bis zum Ende des Studiums blieb. Am 18. Juli 1967 konnte ich mein Medizinisches Staatsexamen dort erfolgreich beenden.

Seit dem 1. Januar 1968 bin ich als Medizinalassistent im St. Brigida Krankenhaus Simmerath, Kreis Monschau/Eifel tätig.

Seit dem 23. August 1967 bin ich mit der Volksschullehrerin Dagmar Klippe, geb. Kölzow, verheiratet.

